

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Requested document:**FR2482309 click here to view the pdf document****Process for the detection of blood group antigens in a histological section and means for its application.**Patent Number: EP0038738

Publication date: 1981-10-28

Inventor(s): FELLA CHRISTIAN PAUL

Applicant(s): FELLA CHRISTIAN PAUL (FR); HAMMOU JEAN CLAUDE (FR)

Requested Patent: FR2482309

Application Number: EP19810400562 19810409

Priority Number(s): FR19800008893 19800421

IPC Classification: G01N33/80

EC Classification: G01N33/80

Equivalents: DK169381, ES8206857, GR74513, JP56166465

Cited Documents:

Abstract

The invention enables the presence of A, B, O or AB blood group antigens in a histological section to be detected readily and accurately. The histological section is exposed to an antiserum monospecific for the A, B or H (O) or AB antigen. The antibodies (2) in the antiserum are labelled, before or after this exposure, with labelling components (4). After binding of the antibodies to the cells carrying antigen (1) and washing of the histological section, the presence of the antigens may be detected by optical examination. The products for carrying out the invention are antisera monospecific for the A, B, O or AB antigen, labelled or otherwise with a fluorescent substance. If the labelling is not carried out in advance, the products entail separate containers. One contains the said antiserum and the other a labelled anti-immunoglobulin serum. Application in assessing the prognosis of malignant tumours.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 482 309

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21) **N° 80 08893**

(54) Procédé de détection de la présence d'antigènes d'un groupe sanguin dans une coupe histologique, et produits pour mettre en œuvre ce procédé.

(51) Classification internationale (Int. Cl. ³). G 01 N 33/80, 21/00, 33/58.

(22) Date de dépôt..... 21 avril 1980.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 46 du 13-11-1981.

(71) Déposant : FELLA Christian Paul et HAMMOU Jean-Claude, résidant en France.

(72) Invention de : Christian Paul Fella et Jean Claude Hammou.

(73) Titulaire : GROUPEMENT D'INTERET ECONOMIQUE FAX, résidant en France.

(74) Mandataire : Cabinet Barnay,
80, rue Saint-Lazare, 75009 Paris.

La présente invention concerne la mise en évidence, au niveau des tissus humains, d'antigènes d'un groupe sanguin A, B, O ou AB.

Jusqu'à présent, la recherche de la présence de 5 ces antigènes a été effectuée au niveau des tissus normaux grâce à une technique utilisée depuis 1956. Cette technique a révélé que l'antigène correspondant au groupe sanguin d'un individu est toujours présent à la surface des cellules qui composent ces tissus.

10 La technique utilisée dans l'art antérieur utilise le marquage des antigènes par des globules rouges. Cette méthode, peu maniable, ne convient pas pour la pratique courante, pour les raisons suivantes : manque de rapidité, fiabilité incertaine (appréciation à plus ou moins 30%), 15 donc difficulté de quantification, et reproductibilité très restreinte du fait de la variété du marqueur utilisé et des conséquences de sa fragilité (phénomènes d'hémolyse, fausse agglutination, mauvaise conservation, impossibilité de congélation).

20 Nous ces facteurs, et notamment le manque de fiabilité du marqueur limitent la diffusion de cette méthode connue.

Or, des travaux ont montré que la présence ou l'absence d'un antigène du type précité constitue un critère 25 d'évaluation pronostique des tumeurs malignes. C'est ainsi que la méthode connue sus-mentionnée a été récemment utilisée pour rechercher à la surface des tumeurs malignes (sein, estomac, colon, col utérin, etc...) l'existence des antigènes de groupes sanguins. En particulier, les derniers 30 travaux ayant porté sur les tumeurs de vessie ont donné par cette technique des résultats intéressants en ce qui concerne l'évaluation pronostique pour ce type tumoral.

La présente invention a pour but de parvenir à un procédé de détection de la présence d'antigènes d'un 35 groupe sanguin A, B, O ou AB dans une coupe histologique, ce procédé étant exempt des inconvénients de l'art antérieur et pouvant être mis en œuvre non pas seulement par un chercheur mais aussi par un laboratoire médical standard ou par un praticien ayant besoin d'un résultat immédiat et

fiable, permettant de ce fait une thérapeutique appropriée.

Selon l'invention, ce but est atteint par le fait qu'on expose la coupe histologique à un antisérum qui est monospécifique humain de l'antigène A ou B ou H (O) ou

5 AB recherché, et l'on marque directement ou indirectement l'anticorps contenu dans cet antisérum, et par le fait qu'après fixation et marquage, ou marquage et fixation, de cet anticorps sur les antigènes de la coupe histologique, on lave cette dernière et on décèle optiquement la présence 10 éventuelle de l'agent marqueur sur cette coupe histologique, une telle présence témoignant que ladite coupe histologique comporte des antigènes du groupe considéré, puisque l'anticorps a été fixé.

Ce procédé admet plusieurs variantes :

15 Dans une première variante le marquage de l'antisérum, c'est-à-dire de l'anticorps qu'il contient, est effectué avant l'exposition de la coupe histologique à l'antisérum. Dans ce cas, l'agent marqueur avec lequel l'antisérum est marqué peut être une substance fluorescente, 20 par exemple la fluorescéine (isothiocyanate de fluorescéine, par exemple) ou la rhodamine, et c'est alors par un examen en lumière ultraviolette que l'on décèle la présence éventuelle de l'agent marqueur sur la coupe histologique.

Dans une deuxième variante, c'est après avoir 25 exposé la coupe histologique à l'antisérum que l'on marque l'anticorps fixé par elle. Ce marquage de l'anticorps fixé peut alors être effectué avec un autre sérum, à savoir un sérum anti-immunoglobuline humaine/^{ou non} marqué, par exemple, par un agent fluorescent tel que fluorescéine ou rhodamine, 30 l'examen optique de la coupe histologique étant ensuite effectué en lumière ultraviolette. Dans cette deuxième variante, le sérum anti-immunoglobuline humaine/^{ou non} peut être marqué non pas par un agent fluorescent mais par une peroxydase et, après application du sérum anti-immunoglobuline 35 humaine/^{ou non} ainsi marqué, on applique alors à la coupe histologique un révélateur selon la technique de Coons des immunopéroxydases et l'on effectue l'examen optique en lumière naturelle.

L'invention a également pour objet des produits

pour mettre en oeuvre le procédé selon l'invention.

Un tel produit convenant pour la mise en oeuvre du procédé dans la première variante est un antisérum monospécifique humain de l'un des groupes A, B, O ou AB, cet antisérum étant marqué soit par une substance fluorescente, telle que fluorescéine ou rhodamine (par exemple).

L'antisérum peut toutefois être marqué par une immuno-péroxydase selon la procédé de Goons, et l'examen est alors fait en lumière blanche après application d'un révélateur.

10 Pour mettre en oeuvre la deuxième variante du procédé, l'invention prévoit un antisérum monospécifique humain A, B, O ou AB non marqué, contenu dans un premier récipient, et un sérum anti-immunoglobuline humaine ou non, contenu dans un deuxième récipient et marqué soit par une 15 substance fluorescente telle que, par exemple, isothiocyanate de fluorescéine ou rhodamine, soit par une péroxydase.

La figure unique du dessin annexé illustre la réaction mise en oeuvre dans le procédé, dans le cas du marquage indirect, c'est-à-dire dans le cas de la deuxième 20 variante :

La référence 1 désigne une cellule avec son antigène, tandis que la référence 2 désigne un anticorps spécifique contenu dans l'antisérum non marqué mis en présence de cette cellule 1. La référence 3 désigne le 25 corps résultant de la fixation de l'anticorps 2 sur la cellule 1. La référence 4 désigne un marqueur, par exemple une anti-immunoglobuline humaine, ^{ou non} marquée mise en présence du corps 3. La référence 5 désigne le corps complexe résultant de la fixation de l'anti-immunoglobuline 30 marquée sur le corps 3. On comprend que si, après élimination complète (par lavage) de tous les éléments 2 et 4 non fixés, l'examen optique révèle la présence d'éléments 4 fixés, cela traduit la présence du l'antigène 1,

35 Si l'on opère selon la première variante (donc au moyen d'un antisérum déjà marqué), c'est alors un corps composé, formé par la fixation d'un marqueur 4 à un anticorps 2 que l'on met en présence de la cellule avec antigène 1, pour obtenir finalement le corps complexe

5 identifiable optiquement.

Les modalités d'exécution sont particulièrement simples et à la portée de tout laboratoire courant.

On opère avantageusement à partir de préparations histologiques déparaffinées non colorées, confectionnées selon les techniques habituelles déjà connues.

Les préparations histologiques déparaffinées sont fixées dans un bain d'acétone pendant 15 minutes, après quoi on les lave, de préférence dans trois bains différents, 10 avantageusement avec une solution tampon à Ph 7,3 (un tampon phosphate commercialisé sous le nom de P.B.S. convient parfaitement). La durée totale du lavage est de l'ordre de 15 minutes. Après séchage des lames (préparations histologiques), on les place dans une boîte métallique, à 15 plat sur des porte-objets et on les recouvre de l'antisérum correspondant. La durée de cette exposition à l'antisérum peut atteindre 30 minutes, voire davantage sans que cela nuise à la réaction.

Si l'antisérum appliqué est un antisérum déjà 20 marqué par une substance fluorescente, on ajoute, au début de l'exposition, quelques gouttes de solution au 1/1000 de bleu Evans (colorant histologique). Si c'est par une peroxydase que l'antisérum est déjà marqué, on rajoute le substrat (ou révélateur) selon la technique 25 de Coons des immunopéroxydases

Si l'antisérum appliqué n'est pas un antisérum déjà marqué, on applique, après lavage succédant à l'exposition, le sérum anti-immunoglobuline humaine ou non, marqué, ou plus avantageusement un sérum anti-immunoglobuline 30 de spécificité M, et l'on procède à une deuxième exposition.

Les préparations sont ensuite lavées, de préférence dans plusieurs bains successifs de solution tampon Ph 7,3 (5 minutes à chaque fois). Après cela on sèche les préparations histologiques et l'on monte les coupes 35 comme suit :

- si l'agent marqueur est une substance fluorescente, avec une goutte de glycérol placée sur une lamelle qui est collée sur la préparation.

- si l'agent marqueur est une peroxydase, le montage se

fait en utilisant une résine synthétique, par exemple la résine commercialisée sous le nom d'Eukitt.

On procède ensuite à la lecture au microscope sous éclairage correspondant au type de marqueur : Eclairage 5 UV et microscope à fluorescence avec filtres appropriés, si le marqueur est une substance fluorescente. Lumière blanche transmise, sans filtre, dans les autres cas.

Bien entendu, ce mode opératoire n'est pas limitatif, et certaines variantes pourraient être 10 envisagées à son égard sans pour autant sortir du cadre de l'invention.

REVENDICATIONS

1.- Procédé de détection de la présence d'antigènes d'un groupe sanguin A, B, O ou AB dans une coupe histologique, caractérisé par le fait qu'on expose la coupe histologique à un antisérum qui est monospécifique humain de l'antigène A ou B ou H (O) ou AB recherché, et l'on marque - directement ou indirectement - l'anticorps contenu dans cet antisérum, et par le fait qu'après fixation et marquage, ou marquage et fixation, de cet anticorps sur les antigènes de la coupe histologique, on lave, cette dernière et on décèle optiquement la présence éventuelle de l'agent marqueur sur cette coupe histologique, une telle présence témoignant que ladite coupe histologique comporte des antigènes du groupe considéré, puisque l'anticorps a été fixé.

2.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que le marquage de l'antisérum, c'est-à-dire de l'anticorps qu'il contient, est effectué avant l'exposition de la coupe histologique à cet antisérum.

3.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que l'agent marqueur avec lequel l'antisérum est marqué est une substance fluorescente, par exemple la fluorescéine ou la rhodamine, et par le fait que c'est par un examen en lumière ultraviolette que l'on décèle la présence éventuelle de l'agent marqueur sur la coupe histologique.

4.- Procédé selon la revendication 1, caractérisé par le fait que c'est après avoir exposé la coupe histologique à l'antisérum que l'on marque l'anticorps fixé par elle.

5.- Procédé selon la revendication 4, caractérisé par le fait que l'on marque l'anticorps avec un autre sérum, à savoir un sérum anti-immunoglobuline marqué.

35 6.- Procédé selon la revendication 5, caractérisé par le fait que le sérum anti-immunoglobuline est marqué par un agent fluorescent, par exemple la fluorescéine ou la rhodamine, et par le fait que c'est par un examen en lumière ultraviolette que l'on décèle la

présence éventuelle de l'agent marqueur sur la coupe histologique.

7.- Procédé selon la revendication 6, caractérisé par le fait que le sérum anti-immunoglobuline est marqué 5 par une peroxydase, et par le fait qu'après application de ce sérum à la coupe histologique préalablement exposée à l'antisérum on applique à celle-ci un révélateur selon la technique de Coons des immunopéroxydases, et l'on effectue l'examen optique en lumière naturelle.

10 8.- Produit pour mettre en oeuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 et 3, caractérisé par un antisérum monospécifique humain de l'un des groupes A, B, O ou AB, cet antisérum étant marqué.

15 9.- Produit selon la revendication 8, caractérisé par le fait que l'antisérum est marqué par une substance fluorescente telle que par exemple la fluoresceine ou la rhodamine.

20 10.- Produits pour mettre en oeuvre le procédé selon l'une quelconque des revendications 1, et 4 à 7, caractérisés par un antisérum monospécifique humain A, B, 25 O ou AB non marqué contenu dans un premier récipient, et par un sérum anti-immunoglobuline contenu dans un deuxième récipient et marqué.

25 11.- Produits selon la revendication 10, caractérisés par le fait que le sérum anti-immunoglobuline est marqué par une substance fluorescente telle que, par exemple, la fluorescéine ou la rhodamine.

30 12.- Produits selon la revendication 10, caractérisés par le fait que le sérum anti-immunoglobuline est marqué par une peroxydase.

13.- Procédé selon la revendication 2, caractérisé par le fait que l'antisérum est un antisérum marqué par une immunopéroxydase selon le procédé de Coons.

1/1

2482309

